



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 199 33 492 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:
C 07 K 7/06
C 07 K 14/195
A 61 K 38/08
A 61 K 38/16

(21) Aktenzeichen: 199 33 492.7
(22) Anmeldetag: 16. 7. 1999
(43) Offenlegungstag: 18. 1. 2001

DE 199 33 492 A 1

<p>(71) Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE</p> <p>(74) Vertreter: Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea Schüßler, 81825 München</p>	<p>(72) Erfinder: Braun, Klaus, 67105 Schifferstadt, DE; Friedrich, Eckart, Prof. Dr., 76831 Illbesheim, DE; Waldeck, Waldemar, Dr., 69514 Laudenbach, DE; Peschke, Peter, Dr., 67459 Böhl-Iggelheim, DE; Pipkorn, Rüdiger, Dr., 69120 Heidelberg, DE; Debus, Jürgen, Prof. Dr., 76698 Ubstadt-Weiher, DE</p> <p>(56) Entgegenhaltungen: Römpf Chemie Lexikon, 10.Aufl. 1998, s.2584, 2585; Molecular Biology of the Cell, 1983, S.344, 345; Drug Design, Vol.X, 1980, S.226-229;</p>
--	---

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- (54) Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen
- (57) Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung. Die Konjugate umfassen:
 - einen Transportvermittler für die Zellmembran,
 - ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid, und
 - einen zu transportierenden Wirkstoff.

DE 199 33 492 A 1

DE 199 33 492 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung.

- Es ist bekannt, daß zelluläre Membransysteme weitestgehend impermeabel für viele Stoffe (z. B. Nukleinsäuren, Proteine, chemische Substanzen) sind, die von außen in die Zelle eingebracht werden sollen. Zum Einbringen von Nukleinsäuren können Zellmembranen durch physikalische Prozesse (Transfektion bei Eukaryonten, Transformation bei Prokaryonten) und biologische Vorgänge (Infektion) überwunden werden. Der Transformation, d. h. dem unmittelbaren Aufnehmen der nackten Nukleinsäure durch die Zelle, geht eine Behandlung der Zellen voraus. Unterschiedliche Methoden zur Erzeugung dieser "kompetenten Zellen" stehen zur Verfügung. Die meisten Verfahren basieren auf den Beobachtungen von Mandel und Higa (J. Mol. Biol. 53, S. 159–162 (1970)), die erstmals zeigen konnten, daß die Ausbeuten bei der Aufnahme von Lambda-DNA durch Bakterien in Gegenwart von Calciumchlorid ganz wesentlich gesteigert werden. Diese Methode ist erstmals von Cohen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, S. 2210–2114 (1972)) für Plasmid-DNA erfolgreich eingesetzt und durch viele Modifikationen verbessert worden. Eine andere Transformationsmethode beruht auf der Beobachtung, daß hochfrequente Wechselstromfelder Zellmembranen aufbrechen können (Elektroporation). Diese Technik läßt sich ausnutzen, um nackte DNA nicht nur in prokaryontische Zellen, sondern auch in eukaryontische Zellsysteme einzuschleusen (Weaver et al., J. Cell Biochem. 51, S. 426–435 (1993)). Zwei sehr sanfte Methoden zur DNA-Einbringung in eukaryontische Zellen wurden von Sikes et al. (Hum. Gen. Therap. 5, S. 837–840 (1994)) bzw. Yang et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, S. 9568–9572 (1990)) entwickelt. Sie beruhen auf der direkten Injektion der DNA in einzelne Zellen (Mikroinjektion) bzw. auf dem Beschuß einer Zellpopulation mit Mikroprojektilen aus Wolfram, an deren Oberfläche die betreffende Nukleinsäure gebunden wurde ("Gene gun"). Parallel zur physikalischen Transformation von Zellen haben sich biologische Infektionsmethoden bewährt. Dazu zählen insbesondere die virale Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen (Chatterjee et al., Science 258, S. 1485–1486 (1992); Cossett and Russell, Gene Therapy 3, S. 946–956 (1996); Bilbao et al., FASEB J. 11, S. 624–634 (1997)) sowie die über Liposomen vermittelte Lipofektion (Bennett et al., J. Drug Targeting 5, S. 149–1562 (1997)). Weiter sind Standardmethoden des liposomalen Transports (Gao and Huang, Gene Therapy 2, S. 710–722 (1995); Akhtar et al., Nucl. Acid. Res. 19, S. 5551–5559 (1991)) und die Poly-L-Lysinierung (Leonetti et al., Bioconj. Chem. 1(2), S. 149 (1990)) von Wirksubstanzen zu nennen, um diese in Zellen einschleusen zu können.
- 30 Trotz der oben aufgezählten Vielzahl von Methoden, die zellulären Membransysteme zu überwinden, gibt es noch keine universelle Methode, um unterschiedliche Wirkstoffe in Zellen hineinzubringen. Alle aufgeführten physikalischen und biochemischen Methoden sind artifiziell und unphysiologisch, insofern als sie nicht zellimmanente Mechanismen nutzen. Viren als Transportmittel sind zum gegenwärtigen Stand immer noch nicht sicher frei von Toxizität und oft auch nicht effektiv. Sie werden auch vom Immunsystem erkannt.
- 35 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, eine Möglichkeit zu entwickeln, die das gerichtete und spezifische Einschleusen von Wirkstoffen in Zellen und Kompartimente erlaubt. Es sind dabei folgende Anforderungen zu erfüllen:

- 40 – universelle Anwendbarkeit
– zell-, kompartiment- und membranspezifisches Einschleusungsverhalten
– hohe Effektivität
– geringe Immunogenität
– Minimierung des Infektionsrisikos
– ausreichend lange Verweildauer

45 Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.
Von den Erfindern wurde ein Konjugat entwickelt, das die folgenden Komponenten aufweist:

- 50 – einen Transportvermittler für die Zellmembran ("P")
– ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid ("AP"), und
– einen zu transportierenden Wirkstoff ("W").

Der Aufbau des erfindungsgemäßen Konjugats ist vorzugsweise:

55 P – AP – W

ganz bevorzugt mit einem Spacer ("SP"):

P – AP – SP – W

- 60 Den Transportvermittler für die Zellmembran (vorstehend mit "P" abgekürzt) stellt ein Peptid bzw. Protein dar, das die Plasmamembran überwinden kann. Die Länge dieses Peptids bzw. Proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die obige Eigenschaft aufweist. Beispiele für "P" stammen vorzugsweise aus der Penetratin-Familie (Derossi et al., 1998, Trends Cell Biol. 8, S. 84–87) oder sind Transportan bzw. Teile davon (Pooga et al., The Faseb Journal (1998), Vol. 12, S. 68 ff.), wobei solche aus der Penetratin-Familie bevorzugt sind. Ein Beispiel für "P" stellt ein Penetratin mit der folgenden Sequenz dar:

NH₂-RQIKIWFQNRRMKWKK-
 (NH₂-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-)

Hergestellt wird die ausgewählte "P"-Sequenz auf biologischem Weg (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z. B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963). 5

Die Auswahl des Adressproteins bzw. -peptids (vorstehend mit "AP" abgekürzt) hängt davon ab, welche Membran bzw. welches Membransystem überwunden und welches Zielkompartiment der Zelle (Cytoplasma, Zellkern, Mitochondrien, Chloroplast, Endoplasmatisches Retikulum) oder der Zellorganelle erreicht werden soll. Die Länge dieses Adress-peptids bzw. -proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die Eigenschaft aufweist, einen zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport zu gewährleisten. Für die Einbringung von Wirkstoffen, insbesondere Nukleinsäuren, werden im allgemeinen "AP" ausgewählt, die ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Erkennungssignal enthalten und dadurch den angehängten Wirkstoff an seinen Wirkort dirigieren. Zur Auswahl stehen "AP", die Wirkstoffe in Gegenwart oder Abwesenheit eines Membranpotentials transportieren können. Grundsätzlich ist für den Transport in das Zellkompartiment die reine Adressesequenz ausreichend. Es können aber auch "AP" ausgewählt werden, die über eine zell- oder kompartimentspezifische Peptidasespaltstelle verfügen. Diese Spaltstelle liegt im günstigsten Fall innerhalb der Signalsequenz, kann aber auch an diese durch zusätzliche Aminosäuren angefügt werden, um nach Erreichen des Zielkompartiments das Abspalten der Adressesequenz sicherzustellen. Hergestellt wird die ausgewählte "AP"-Sequenz auf biologischem (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryontischen oder prokaryontischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z. B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963). Beispiele für Adressproteine bzw. -peptide sind: 10
 Import in das ER 15
 20
 25

H₃N⁺-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-

Reimport in das ER

H₂N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO⁻

Import in Mitochondrien

H₃N⁺-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu

Import in den Zellkern

-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen)

Import in Peroxisomen

H₂N-Ser-Lys-Leu-COO⁻

Bindung an die Zellmembran

H₃N⁺-Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys-

Weiter kann das Konjugat ggf. einen Spacer (vorstehend mit "SP" abgekürzt) enthalten, der sich vorzugsweise zwischen dem Adressprotein-/peptid und dem zu transportierenden Wirkstoff befindet. Er kann aber zusätzlich oder alternativ auch zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein vorliegen. Der Spacer dient dazu, ggf. vorhandene sterische Wechselwirkungen zwischen den Komponenten aufzuheben bzw. günstig zu beeinflussen. Der Spacer kann bei- 65

DE 199 33 492 A 1

spielsweise ausgewählt sein aus: Polylysin, Polyethylenglykol (PEG), Derivate der Poly-Methacrylsäure oder Polyvinylpyrrolidon (PVP).

5 Zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein/-peptid ist vorzugsweise eine Redoxspaltstelle, z. B. -Cystein-S-S-Cystein-O-N-H-. Die zwischen Transportvermittler und Adressprotein entstehende Bindung ist eine Redoxkopplung (schonende zellinvasive Verknüpfung mittels DMSO; Rietsch und Beckwith, 1998, Annu. Rev. Gent 32, S. 163–84):



- 10 Der Wirkstoff bzw. die Wirksubstanz (vorstehend mit "W" abgekürzt) unterliegt keinerlei Beschränkungen. Er ist frei wählbar, je nach Wunsch, welche Wirkung in einer Zelle erzeugt werden soll. Der Wirkstoff kann ein Diagnostikum und/oder Therapeutikum sein. Es kann auch mehr als ein Wirkstoff in dem Konjugat vorhanden sein. Der Wirkstoff kann ggf. markiert sein, z. B. radioaktiv, mit einem Farbstoff, mit Biotin/Avidin usw. Der Wirkstoff kann eine Nukleinsäure, ein Protein bzw. Peptid, eine chemische Substanz usw. sein. Beispielsweise seien genannt: cDNA, genomische DNA, vollständige Gene, regulatorische Elemente, Transkriptionsfaktoren, Molekularsonden, Oligonukleotide, mRNA, Antisense-RNA, Antisense-Oligonukleotide, Plasmide, virale DNA, synthetische Nukleotide, PNA (Peptide Nucleic Acids), einzelne Aminosäuren, Peptide, Proteine, monoklonale und/oder polyklonale Antikörper, pharmazeutische Wirkstoffe, Chemotherapeutika, Farbstoffe, Sensibilisatoren.
- 15 Die Synthese der Konjugatbestandteile "P" und "AP" erfolgt vorzugsweise synthetisch nach der Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963). Die Ankopplung der anderen Bestandteile (z. B. Spacer und/oder Wirkstoff) daran erfolgt durch kovalente chemische Bindung. Die Einführung der Redoxspaltstelle zwischen "P" und "AP" erfolgt auf chemischen Wege durch die oben erwähnte Redoxkopplung. Auch zwischen einem ggf. vorhandenen Spacer und dem Wirkstoff bzw. dem Adressprotein und dem Wirkstoff liegt eine kovalente Bindung vor, bevorzugt eine Säureamid-Bindung. Mögliche Alternativen sind Ether- oder Ester-Bindungen, je nach den in der zu konjugierenden Substanz 20 vorhandenen funktionellen Gruppe(n).

25 Das Konjugat wird bevorzugt in folgenden Schritten aufgebaut:

20 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers (z. B. nach der Merrifield-Methode)

25 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,

30 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung (z. B. in Wasser/DMSO)

35 4) Reinigung (z. B. mittels HPLC)

40 Die erfundungsgemäßen Konjugate haben den Vorteil, unabhängig von Art und Größe eines Wirkstoffs, diesen in Zellen einzubringen und in das gewünschte Zellkompartiment transportieren zu können. Es ist somit eine Verbesserung in Diagnostik und Therapie in Human- und Tiermedizin sowie eine Anwendung in der wissenschaftlichen Forschung zu erwarten. Insbesondere die Gentherapie kann durch die erfundungsgemäßen Konjugate einen Aufschwung erwarten, da vollständige Gene einschließlich ihrer regulatorischen Elemente transportierbar werden. Aber auch alle anderen Wirkstoffe lassen sich mit den erfundungsgemäßen Konjugaten spezifischer an den Wirkort bringen, was das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen reduziert. Es wurde gefunden, daß Konjugate bis 25 MDa in das Zellinnere einzubringen 45 sind. Darüber hinaus kommt es oftmals zur Auslösung von Apoptose, was durchaus ein gewünschter Effekt sein kann. Die erfundungsgemäßen Konjugate zeichnen sich durch eine universelle Einsetzbarkeit aufgrund ihres zell-, kompartiment- und membranspezifischen Einschleusungsverhaltens aus.

50 Die Erfundung wird weiter anhand der beigefügten Figuren beschrieben:
Fig. 1 erfundungsgemäßes Konjugat,
Fig. 2 Generelles Schema der Fmoc-Synthese,
Fig. 3 Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Messung an AT1-Zellen

- 55 A) Konjugat-Konzentration: 50 nM
Inkubationszeit: 5 Std.
B) Konjugat-Konzentration: 5 nM
Inkubationszeit: 5 Std.
C) Konjugat-Konzentration: 50 nM
Inkubationszeit: 24 Std.
D) Konjugat-Konzentration: 5 nM
Inkubationszeit: 24 Std.

Die Erfundung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1

60 Konjugat aufweisend einen Penetratin-Bestandteil, eine NLS, einen Polylysin-Space und Rhodamin

Zum Aufbau des Konjugats wird auf Fig. 1 verwiesen.

65 Penetratin: NH₂-RQIKIWFQNRRMKWKK-

NLS (Nuclear Localisation Sequence): NH₂-PKKKRKV

DE 199 33 492 A 1

Spacer ((Lys)₂): NH-CH₂-(CH₂)₃-CHNH₂-CO-NH-CH₂-(CH₂)₃-CHN₂-CO-NH

Die Penetratinsequenz, die NLS und der Spacer wurden nach der Standard Fmoc-Methode ("Peptide", H.-D. Jakubke, Chemie und Biologie Spektrum, Akad. Verl. 1996, ISBN 3-8274-0000-7) getrennt synthetisiert. Das generelle Schema der Fmoc-Synthese ist in Fig. 2 gezeigt. Zur Synthese der verschiedenen Komponenten-Sequenzen wird zuerst die erste Fmoc-Aminosäure (käuflich erhältlich von Fa. Calbiochem GmbH, D-65796 Bad Soden) an ein unlösliches Polystyrol-Trägerharz über einen säurelabilen Linker (= para-Benzyl-oxybenzyl-alkohol-handle) angefügt. Die Abspaltung der Schutzgruppe wird durch Behandlung des Harzes mit 20% Piperidin in Dimethylformamid erreicht. Die zweite Fmoc-Aminosäure wird unter Verwendung einer präaktivierten Spezies (z. B. in den Aminosäure-Einzelbestandteilen vorhandenen Succinimid-, Pentafluorphenylester- oder p-Nitrophenylestergruppen) oder in-situ Aktivierung angekoppelt, jeweils nachdem von der vorhergehenden Aminosäure die Schutzgruppe durch basische Behandlung entfernt worden ist. Jede weitere Aminosäure wird analog angekoppelt. Nachdem das gewünschte Peptid synthetisiert worden ist, wird dieses mittels Behandlung mit 95% Trifluoressigsäure (TFA) + 5% Scavenger (z. B. Triethylsilan) von dem Träger entfernt und die Schutzgruppen abgespalten. Die entstandenen Roh-Peptide werden durch präparative HPLC auf einer YMC ODS-A 7A S-5 µm Umkehrphasensäule (20 × 250 mm) unter Verwendung eines Elutionsmittels enthaltend 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser (A) bzw. 60% wässrigem Acetonitril (B) gereinigt. Die Peptide wurden mit einem sukzessiven linearen Gradienten von 25% B bis 60% B in 40 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min eluiert. Die den gereinigten Peptiden entsprechenden Fraktionen wurden lyophilisiert.

Die aufgerückten Peptid-Komponenten werden gemeinsam mit 20%iger wässriger DMSO-Lösung über 5 Stunden bei Raumtemperatur behandelt, wodurch eine oxidative Kopplung der Komponenten resultiert. An den Spacer wird als zu transportierende Wirksubstanz, z. B. Rhodamin 110, gekoppelt. Dies erfolgt durch Säureamid-Kopplung an der freien α-Aminogruppe des Lysinspacer. Das komplette Konjugat wird anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

Beispiel 2

Einbringen eines erfundungsgemäßen Konjugats in Zellen

AT-1 und DU-145 Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/min. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.

Zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) lädt man AT-1 Zellen auf Objekträgern 24 Std. anwachsen. Nach Mediumwechsel mit farbstofffreiem RPMI 1640 (ohne Phenolrot) wird das Konjugat von Beispiel 1 (100 nM) mit RPMI auf die Zellen gegeben und 5, 24 bzw. 48 Std. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wird das Konjugat enthaltende Medium entfernt und zweimal mit 200 µl farbstofffreiem RPMI gewaschen und anschließend per FCS gemessen. Die Anregung mit dem Laser erfolgt bei 488 nm und die Emission bei 538 nm.

Das Konjugat wird auf dem Weg in den Zellkern verfolgt. Dazu wird unter dem Lichtmikroskop eine Zelle ausgewählt und fokussiert. Nach Focusierung und Justierung des Lasers wird in 100 µm Schritten durch die Zellen gefahren, und die Fluoreszenz wird in Form von Lichtblitzen über Photomultiplier gemessen. Dabei wandern große Moleküle und kleine Moleküle unterschiedlich schnell. Erfasst wird die Anzahl der diffundierenden Moleküle in einem Bereich von jeweils 100 µm. So lässt sich mit der Signaldauer die Größe der diffundierten Moleküle bestimmen. Die dazugehörige Grafik ist in Fig. 3 gezeigt.

In einem weiteren Experiment wird die Kinetik, mit der das Konjugat ins Cytoplasma gelangt, mit dem gleichen Verfahren ermittelt. Die AT-1 Zellen wurden wieder 24 Std. adhäriert. Das das Konjugat enthaltende Medium wurde wie vorhergehend beschrieben eingesetzt. Allerdings wurde jetzt sofort das Fluoreszenzsignal mit der FCS gemessen.

Die FCS zeigte deutlich eine starke Anreicherung an der Zellmembran nach 5 Stunden Inkubationszeit. Eine Diffusion war nicht zu erkennen. Nach 24 Std. Inkubationszeit zeigten sich nur noch geringfügige Mengen an Konjugat in der Zellmembran. Auffällig war jetzt eine Anreicherung im Kern, die sich im Beobachtungszeitraum von 48 Std. noch verstärkte.

Zur Kontrolle wurden Konjugate eingesetzt, bei denen Rhodamin 110 entweder nur an Penetratin oder an NLS gebunden war. Diese zeigten nicht den vorstehend beschriebenen Effekt der Zellkernanreicherung. Die Konjugate wurden, falls sie überhaupt den Übertritt in die Zelle schafften, an der Zellmembran bzw. der Nuclearhülle gehalten und reicherteten sich dort an.

Patentansprüche

1. Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports, wobei das Konjugat die folgenden Komponenten aufweist:
 - einen Transportvermittler für die Zellmembran,
 - ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid, und
 - einen zu transportierenden Wirkstoff.
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die Plasmamembran überwinden kann.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Transportvermittler aus der Penetratin-Familie stammt oder Transportan oder Teile davon ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei eine der Penetratine folgende Sequenz hat:

NH₂-RQIKIWFQNRRMKWKK-
5. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zell-, kompartiment- oder membranspezifische

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 199 33 492 A 1

Adressprotein bzw. -peptid ausgewählt ist aus:
für Import in das ER

5 H₃N⁺-Met-Met-Ser-Phe-Val-
 Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-
 Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-
 Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-
 Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-

10 für Reimport in das ER

 H₂N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO⁻

15 für Import in Mitochondrien

15 H₃N⁺-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-
 Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-
 Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-
 Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-
 Leu-Leu

20 für Import in den Zellkern

25 -Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-
 Lys-Val

30 H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-
 Lys-Val - (= Nuclear
 localisation sequence aus
 SV40-T-Antigen)

35 für Import in Peroxisomen

 H₂N-Ser-Lys-Leu-COO⁻

35 für Bindung an die Zellmembran

40 H₃N⁺-Gly-Ser-Ser-Lys-
 Ser-Lys-Pro-Lys-

45 6. Konjugat nach Anspruch 5, wobei die Sequenz für den Import in den Zellkern folgende Sequenz hat:

 H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-.

45 7. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff ausgewählt ist aus Nukleinsäuren, Proteinen/Peptiden und/oder chemischen Substanzen.

45 8. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Konjugat folgenden Aufbau hat:

50 Transportvermittler – Adressprotein – Wirkstoff.

50 9. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ggf. weiter ein Spacer vorhanden ist.

50 10. Konjugat nach Anspruch 9, wobei sich der Spacer zwischen dem Adressprotein und dem Wirkstoff befindet.

50 11. Konjugat nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Spacer Polylysin, Polyethylenglykol oder Polyvinylpyrrolidon ist.

55 12. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1–11 aufweisend die folgenden Schritte:

- 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers
- 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
- 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung

60 13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Peptidsynthese gemäß der bekannten Merrifield-Methode durchgeführt wird.

60 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Redoxkopplung in einer wässrigen DMSO-Lösung durchgeführt wird.

60 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12–14, wobei sich noch ein Reinigungsschritt anschließt.

60 16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Reinigung mittels HPLC stattfindet.

65 17. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1–11, zum zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport eines gewünschten Wirkstoffs.

DE 199 33 492 A 1

18. Verwendung nach Anspruch 17, zum Einsatz in Diagnose und/oder Therapie.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

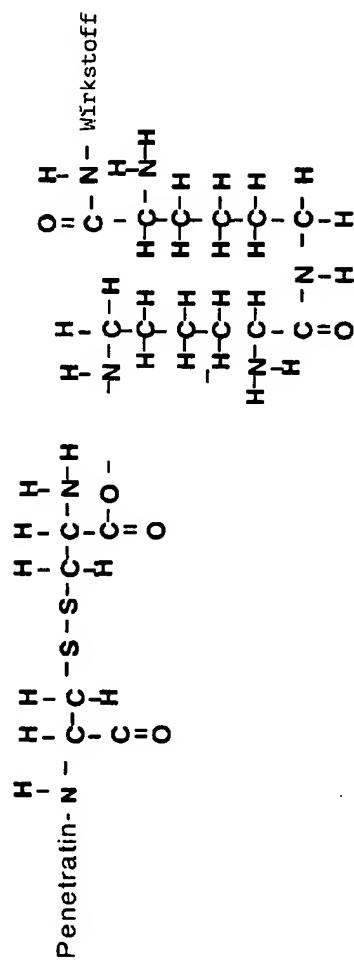
60

65

PNA-Konjugat Konstrukt - Schema

Penetratin-Cy-S-S-CyONH- NLS- NH-CH₂-(CH₂)₃-CHNH₂-CO-NH-CH₂-(CH₂)₃-CHNH₂- CO-NH- WIRKSTOFF

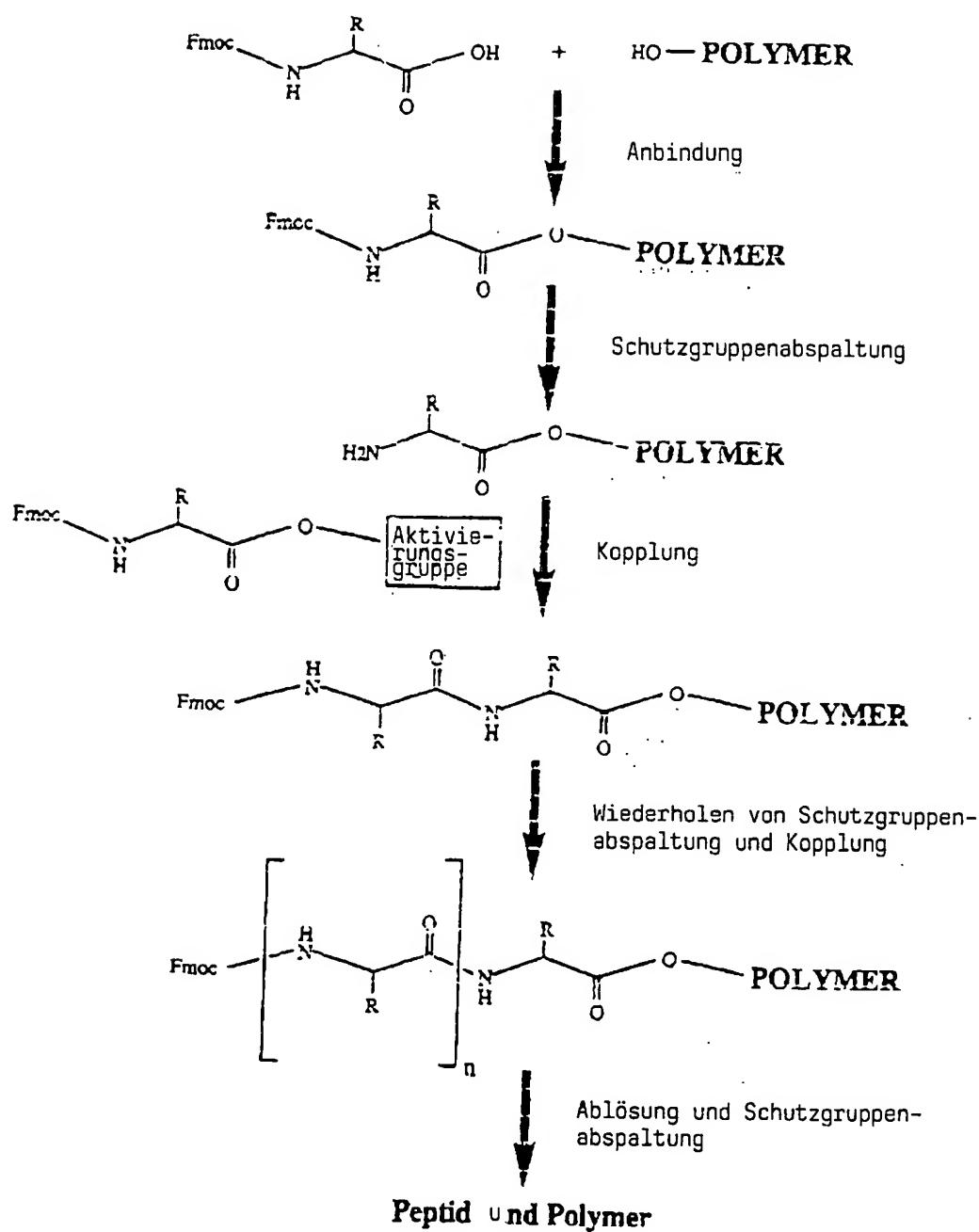
Transport Redox-Spaltung Nukl.Loc.Sequ.



Transportprotein Cystein Redox-Trennstelle Nuklear Lokalisierung Sequenz Spacer spezif. Sequenz

Penetratin:	P: (pAntp):	RQIKIWFQNRRMKWKK-
NLS:	(Nucl. Localis. Signal)	KKKKRKREK

Fig. 1



Allgemeines Schema für Fmoc Synthese

Fig. 2

Zelluläre Aufnahme des erfindungsgemäßen Konjugats

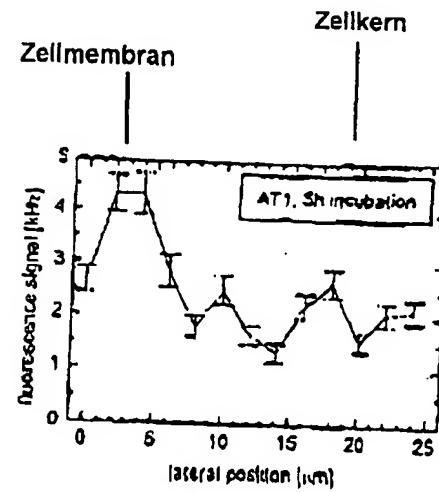
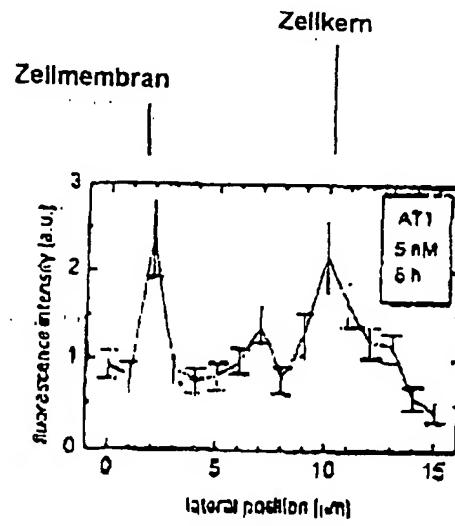
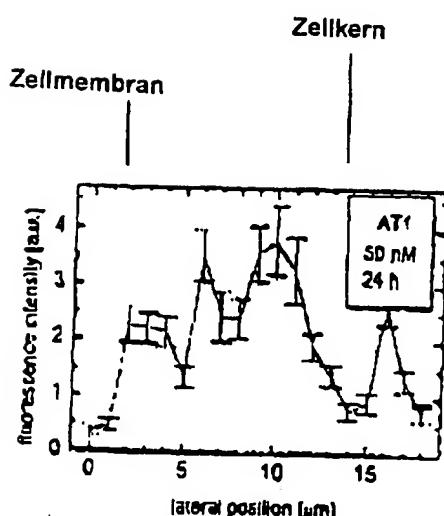
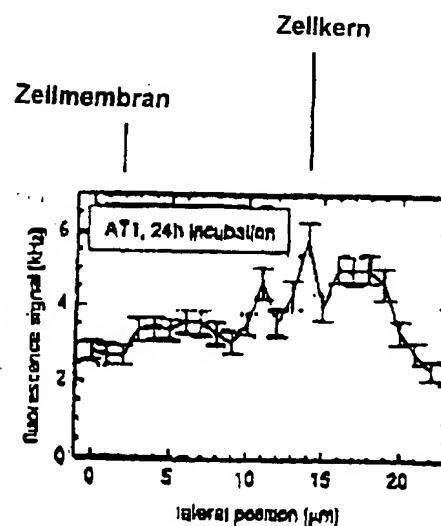
**A****B****C****D**

Fig. 3